

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-513240

(P2003-513240A)

(43) 公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 27/447		B 0 1 D 57/02	2 G 0 4 5
B 0 1 D 57/02		B 0 3 C 5/00	Z 4 D 0 5 4
B 0 3 C 5/00		C 0 7 K 1/14	4 H 0 4 5
C 0 7 K 1/14		G 0 1 N 33/48	A
C 1 2 N 15/00		33/483	F
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-533412(P2001-533412)  
 (86) (22) 出願日 平成12年10月25日(2000.10.25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年4月26日(2002.4.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR00/02974  
 (87) 国際公開番号 WO01/031325  
 (87) 国際公開日 平成13年5月3日(2001.5.3)  
 (31) 優先権主張番号 99/13366  
 (32) 優先日 平成11年10月26日(1999.10.26)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US

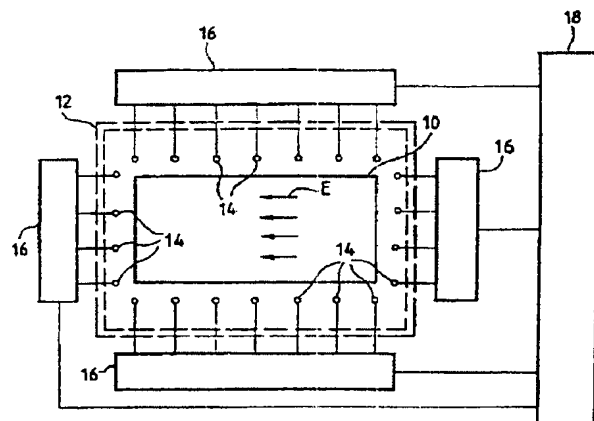
(71) 出願人 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・レシエル  
 シュ・サイエンティフィック  
 フランス・F-75794・パリ・セデックス  
 ス・16・リュ・ミシェル・アンジュ・3  
 (72) 発明者 ジュリアン、ルドビーク  
 フランス国、エフ-94110 アルクイエ、  
 リュ・ドゥ・ラ・シタデル 77  
 (72) 発明者 ルマルシャン、エルベ  
 フランス国、エフ-91360 ビルモワソ  
 ン・スール・オルジュ、アブニユ・デュ・  
 グラン・オルム 45  
 (74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲルなどの媒体中での拡散によって類似化合物の混合物中の化学化合物または生物化合物を分離する方法

## (57) 【要約】

本発明は、類似化合物の混合物中に存在する化学化合物又は生物化合物を、動力学定数が一化合物と他の化合物とで異なる可逆反応において混合物中の化合物と反応する成分 (P) を含むゲル中で拡散により分離する方法に関する。該方法は、媒体 (10) に例えば時間により周期的に変化する電場 (E) をかけることからなる。前記場の周期及び媒体 (10) 中の反応成分の濃度は、分離される化合物の動力学定数に基づき、前記反応と印加された場の共鳴条件が決定される。そのため、媒体中の化合物の見かけの拡散係数は最大値である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲルなどの媒体（10）中での拡散によって類似化合物の混合物中の化学または生物化合物を分離する方法であって、媒体中に化合物の混合物を導入する工程を含み、以下で構成されることを特徴とする方法：

- ・媒体（10）中の混合物の化合物（ $C_i$ ）を媒体中に存在する成分Pと反応させて生成物（ $Q_i$ ）を得ること。反応 $C_i + P \rightarrow Q_i$ は可逆的であり、生成物（ $Q_i$ ）の生成方向に動力学定数 $k_{1,i}$ を、逆方向に（ $k_{2,i}$ ）を有する；および

- ・時間により周期的に変化し、（ $C_i$ ）が感受性である場を媒体に印加すること。前記反応と場の間の共鳴条件を確立するために、場の周期および媒体中の成分（P）の濃度は、分離される化合物（C）の動力学定数（ $k_1$ 、 $k_2$ ）の関数として決定され、そのため化合物（C）は最大値である、媒体中での見かけの拡散係数を有する。

【請求項2】 場の振幅が化合物（C）の前記動力学定数及び固有の拡散係数の関数である限界値よりも高いことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 混合物中の化合物（ $C_i$ ）が少なくとも成分（P）との反応における動力学定数の値において相互に異なることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 分離される化合物（C）の動力学定数の1つが、混合物中の他の化合物の動力学定数の大きさと少なくとも1桁異なることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 場の周期が実質的に $\pi / k_2$ に等しく、媒体（10）中の成分（P）の濃度が実質的に $k_1 / k_2$ に等しいことを特徴とする、請求項1乃至4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 媒体（10）中の成分（P）の濃度が分離の間実質的に一定に維持されることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 場の振幅がゼロ平均値周辺で変化する、請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 媒体（10）中において場が実質的に一定であることを特徴

とする、請求項1乃至7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 前記場が電場である、請求項1乃至8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 前記場が媒体中の速度場であることを特徴とする、請求項1乃至9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 成分(P)及び生成物(Q<sub>i</sub>)が、前記場が印加された媒体(10)中で実質的に静止したままであることを特徴とする、請求項1乃至10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 生成物(Q<sub>i</sub>)が化合物(C<sub>i</sub>)とは異なる態様で媒体(10)が用いられた場に反応することを特徴とする、請求項1乃至10のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 分離される化合物が約 $10 \sim 10^6$ ダルトンの範囲のサイズを有する分子であることを特徴とする、請求項1乃至10のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 分離される化合物がタンパク質、オリゴヌクレオチド又はオリゴ糖であることを特徴とする、請求項1乃至11のいずれかに記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明はゲルなどの適切な媒体の拡散によって、類似化合物の混合物に存在する化学化合物または生物化合物を分離する方法に関する。

**【0002】**

混合物中に存在する化合物を分離する既知の方法は一般に、（広義における）化学反応および／または一連の外力を化合物の混合物に加えることを含む。たとえばアフィニティー・クロマトグラフィは、分子の混合物を取り、それらの分子が溶出先端および末端で特別の位置を占有するため、クロマトグラフィ支持体に結合された相互作用部位に関して、最も強く保持される抽出物または最も弱く保持される分子を抽出することができる。しかし特に、混合物が10以上の類似化合物を含む場合、中間の親和性を持つ化合物を分離することは困難であり、定量的に定義される親和性を持つ化合物を分離することは非常に困難であり、親和性が同一であるが、異なる動力学相互作用定数を持つ化合物を分離することは不可能である。

**【0003】**

混合物中に存在し、オペレータが任意に定義する所与の標的に対する動力学相互作用定数を持つ、化合物の分離に関する問題は主として、生物学的興味のある適切に選択された標的（遺伝子配列、タンパク質、．．．）と分子の相互作用の最適化に基づく新しい治療処置の開発の分野、そして試験分子が同様の分子の「制御された混合物」の形で得られることが多い結合化学の分野に存在する。

**【0004】**

本発明は、この問題に対する簡単かつ効果的で、比較的容易に実施される解決法を与えることを目的としている。

**【0005】**

このため本発明は、ゲルなどの媒体中での拡散によって類似化合物の混合物中の化学または生物化合物を分離する方法を提案し、該方法は、媒体中に化合物の混合物を導入する工程を含み、以下で構成されることを特徴とする：

- ・媒体中の混合物の化合物C<sub>1</sub>を媒体中に存在する成分Pと反応させて生成物

$Q_i$  を得ること。反応  $C_i + P \rightarrow Q_i$  は可逆的であり、生成物  $Q_i$  の生成方向に動力学定数  $k_{1,i}$  を、逆方向に  $k_{2,i}$  を有する；および

・時間により周期的に変化し、 $C_i$  が感受性である場を媒体に印加すること。  
前記反応と場の間の共鳴条件を確立するために、場の周期および媒体中の成分  $P$  の濃度は、分離される化合物  $C$  の動力学定数  $k_1$ 、 $k_2$  の関数として決定され、そのため化合物  $C$  は最大値である、媒体中での見かけの拡散係数を持つ。

#### 【0006】

本発明により、標的によって化合物  $C$  の動力学反応定数がわかると、媒体中の標的の濃度と、化合物の見かけの拡散係数が最大となり、他の化合物の見かけの拡散係数よりもはるかに高くなる場の周期性が決定できるため、この化合物は媒体中での拡散により他の化合物から完全に分離される。

#### 【0007】

混合物中に存在する化合物が、以前定義した標的と実質的に同様に挙動し、動力学相互作用定数のみが互いに異なる場合でも、本発明の方法は、媒体中の標的濃度と媒体に印加される場の周期を定義することができるために、分離される化合物の媒体中での見かけの拡散係数は、反応物と印加場との確率論的共鳴の結果として最大である。

#### 【0008】

例として、分離される化合物  $C$  の動力学定数の1つが、混合物中の残りの化合物とは1桁異なる場合、化合物の他の特徴は同一または同様であり、媒体中の化合物  $C$  の見かけの拡散係数は、混合物中の残りの化合物の見かけの拡散係数よりも3.5倍以上高いため、拡散によって残りの化合物から分離できるだけでなく、有利な収率で比較的高い純度で媒体から抽出することもできる。

#### 【0009】

本発明の好ましい実施形態において、媒体に加えられる場は電場であり、本方法は、たとえば電解質を充填したタンクを含む従来の電気泳動装置において実施し、装置中には適切なゲル板を、ゲル板を包囲するタンク内に配置し、その間隔にわたって均質であり、時間とともに周期的に変化する電場をゲル板に供給することのできる電源手段に接続された電極に沿って配置する。

**【0010】**

変形において、前記場は、媒体中の速度場であり、方法はたとえば、1個または2個のポンプによって媒体中に不活性担体液の均質な速度場を作成するHPLC（高速液体クロマトグラフィ）などのクロマトグラフィ装置で実施する。

**【0011】**

実施例より成る以下の説明により、そして以下の添付図を参照することによって、本発明はよりよく理解され、そのさらなる特徴、詳細および利点がさらに明確になるであろう。

**【0012】**

図1は、電気泳動装置を用いて方法を実施する、本発明の実施形態を示す図である；参照番号10は、たとえばアガロースゲルなど電気泳動に日常的に使用される種類の、ゲルなどの媒体の板を示す。

**【0013】**

ゲル板10は、輪郭を点線で示され、たとえば図の平面に垂直に伸びる導線によって形成された電極の列14が配列されている電気泳動タンク12内に配置されている。

**【0014】**

電極14はたとえば、ゲル板10の4つの側面の周囲に配列され、電源供給回路16に接続されており、それ自体は、場合によってはコンピュータ制御が可能である制御手段18に接続されている。

**【0015】**

これらの供給手段16および制御手段18によって、ゲル板10に電場を与えることが可能となり、この場は時間とともに周期的に変化し、間隔内では実質的に均一である、すなわちゲル板10のどの地点でも同一である。この電場はたとえば、ゲル板の平面方向、矢印Eで示される方向に向けられる。

**【0016】**

本技術は、電気泳動において周知であり、国際特許出願公開第WO-A-84/02001号および米国特許第US-A-5084157号に記載されており、さらに詳細には参照する必要がある。

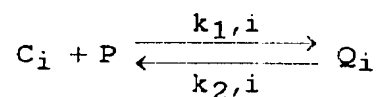
## 【0017】

本発明の方法は、周期的な電場を化合物の混合物に印加することから生じる電気泳動が反応性媒体において発生し、電場が平均のゼロ値周囲で周期的に変化するという点で、周知の電気泳動技術と実質的に異なる。

## 【0018】

本発明によって、媒体10のある点で注入される混合物中に含まれる化合物と反応する規定濃度の成分Pを含む媒体10を使用し、この混合物の化合物 $C_i$ が成分Pと反応して生成物 $Q_i$ を生成し、それ自体は以下に示すように初期生成物 $C_i$ およびPに分解する：

## 【数1】



式中、 $k_{1,i}$  および  $k_{2,i}$  はある方向および逆方向の動力学反応定数であり、ある化合物 $C_i$ から別の化合物で変化し、 $k_{1,i}$  は単位濃度当たりおよび単位時間当たりの反応数であり、 $k_{2,i}$  は単位時間当たりの反応数である。

## 【0019】

以下の考察では、媒体10に注入される混合物を形成する化合物 $C_i$ が媒体中で同じ質量 $m$ 、同じ電荷 $z$ 、同じ摩擦係数 $\gamma$ をもち、その媒体中で同じ拡散係数 $D$ を持つと仮定される、最も難しいケースを扱う。媒体10中に存在する成分Pは、電場に非感受性および不動であるか、媒体10中でわずかに拡散することができるかと仮定される。このことは共有結合的に固定されているためか、その寸法が媒体10中での変位を制限しているためかのどちらかである。化合物 $Q_i$ は移動可能であるため、化合物 $C_i$ の反応とは異なる、場の作用に対する反応を示す。

## 【0020】

成分Pの濃度が媒体10中で実質的に均一であり、分離の間じゅうこの媒体中で実質的に一定に維持されるということも仮定される。

## 【0021】

媒体10に加えた電場が時間とともに、たとえば  $E(t) = a \sin(\omega t)$  という形で正弦的に変化する場合、媒体10に加えられた電場に対する平行な軸に沿った化合物Cの位置  $x$  における平均値  $\bar{x}_C(t)$  および分散  $\sigma_C^2(t)$  が計算できる。以下の式が得られる：

## 【数2】

$$\bar{x}_C(t) = \frac{A}{(c_1 + c_2)^2 + \omega^2} \left[ c_1(1 + \cos \omega t) + \frac{c_1 c_2 + c_2^2 + \omega^2}{\omega} \sin \omega t \right]$$

さらに同様に：

## 【数3】

$$\sigma_Q^2(t) = \frac{A}{(c_1 + c_2)^2 + \omega^2} \left[ c_1 + \frac{c_2}{\omega} ((c_1 + c_2) \sin \omega t - \omega \cos \omega t) \right]$$

式中：  $A = z a / m y$  は電場の再校正された振幅である；

$c_1 = k_1 p$ 、 $p$  は媒体10中の  $p$  の濃度である；

$c_2 = k_2$  ；

$c_1$  および  $c_2$  は  $s^{-1}$  で表現される。

## 【0022】

平均印加電場がゼロであるならば、初期条件が非対称であるために、化合物C<sub>i</sub> およびQ<sub>i</sub>の平均位置はゼロ以外の値の周囲で振動し、系は部分的に電場の最初の可動域の記憶を部分的に保持している。定数項および振動項を無視すると、PおよびQ<sub>i</sub>の静止値の場合、非常に短い過渡状態の後、分散C<sub>i</sub>( $x$ ,  $t$ ) およびQ<sub>i</sub>( $x$ ,  $t$ )に関連する位置の変化は以下のように減少する：

## 【数4】



$$\sigma_c^2(t) = \sigma_Q^2(t) = 2D_a t$$

式中、

【数5】

$$D_a = \frac{c_2}{c_1 + c_2} \left[ D + A^2 \frac{c_1}{2(c_1 + c_2)^2 + \omega^2} \right]$$

$D_a$  は対  $C_i$ 、 $Q_i$  の見かけの拡散係数であり、 $D$  は 化合物  $C_i$  の固有拡散係数である。

【0023】

電場の振幅が以下の関係を満足するのに十分である場合：

【数6】

$$A^2 \gg 2D / c_1 ((c_1 + c_2)^2 + \omega^2)$$

見かけの拡散係数は  $D$  に依存せず、化学反応および電場によってのみ制御され、見かけの拡散係数は以下の関係によって与えられる：

【数7】

$$D_a = A^2 \frac{c_1 c_2}{2(c_1 + c_2) [(c_1 + c_2)^2 + \omega^2]}$$

この場合、 $Q_i$  が静止である場合に  $A = z a / m \gamma$  となるか、 $A = z a / m \lambda - Z_0 a / m_0 \gamma_0$  であり、式中  $Z_0$  は  $Z_i$  によって運ばれる電荷であり、 $m_0$  は  $Q_i$  の質量であり、 $\gamma_Q$  は  $Q_i$  が静止である場合の摩擦係数である。

【0024】

この見かけの拡散係数は、電場の再校正された振幅  $A$  の値によって定義される、任意の高い値を取ることができる。

## 【0025】

この見かけの拡散係数は、 $c_1$  および  $c_2$  の関数であり、（電場の振幅が十分な場合）以下によって得られる1個の最大値を含む：

$$c_1^R = c_2^R = \omega / 2$$

$$\text{あるいは、同等の方法では： } k_1^R \cdot p = k_2^R = \pi / T$$

式中、指数Rは共鳴条件を表し、Tは電場の周期である。

## 【0026】

図2において、実線の曲線は、共鳴時のAの関数としての比  $D_a / D$  における変化を示し、破線の曲線は、動力学定数  $k_1^R$  および  $k_2^R / 10$  に対するAの関数としてのこの比の変化を示し、短い点線の曲線は動力学定数  $10 k_1^R$ 、 $10 k_2^R$  に対するAの関数としてのこの比の変化を示し、点線の曲線は、動力学定数が  $10 k_1^R$  および  $k_2^R$  に等しい場合のAの関数としてのこの比の変化を示す。

## 【0027】

図3は、 $c_1$  および  $c_2$  の基数10に対する対数の関数としての比  $D_a / D$  における変化を示し、変化の最大値は、上述した共鳴条件に相当する。

## 【0028】

化学反応が無作為の事象と見なされる場合、 $C_i$  と  $Q_i$  の間の転移は確率的事象であり、 $D_a$  の最大値は、化学反応と媒体10に印加される電場の間の確率的共鳴に相当する条件に対して得られる。

## 【0029】

化合物  $C_i$  の見かけの拡散係数の最大値を生じ、この化合物Cが混合物中に存在する他の成分  $C_i$  から分離させることができるのは、この共鳴である。特に、化合物  $C_i$  の動力学定数の1つが化合物Cの動力学定数に等しい場合、そのために共鳴が存在し、化合物  $C_i$  の他の動力学定数が化合物Cの他の動力学定数と10倍も異なるため、化合物  $C_i$  の見かけの拡散定数は化合物Cの見かけの拡散定数よりも約3.5倍も小さくなると考えられる。

## 【0030】

拡散のこのような相違によって、後者が実質的にCと同じ電荷、同じ質量およ

び同じ摩擦係数を持つか、実質的にCと同じ比 $z/m y$ を持ち（Aの値はこれらすべての成分について実質的に同じである）、少なくとも成分（P）との反応における動力学定数の値が相互に異なる場合でも、化合物Cを類似成分 $C_1$ から分離することができる。

### 【0031】

媒体10に印加される電場は、いかなる方法でも時間によって周期的に変化させられる：変化は正弦、方形波またはその他でも可能である。

### 【0032】

共鳴条件に相当する化合物Cの最大の拡散によって、混合物の他の化合物 $C_1$ から、一部は媒体10の分布プロファイルの端から分離および回収することができる。濃度が同じで固有拡散係数が異なる2つの化合物（ $C_1$ ， $C_2$ ）の場合、以下の式を用いて化合物 $C_1$ を回収する場合の純度および収率を計算することができる：

### 【数8】

$$\text{純度} : S(\alpha_1) = \frac{I(\alpha_1)}{I(\alpha_1) + I(\alpha_2)}$$

$$\text{収率} : R(\alpha_1) = \frac{2I(\alpha_1)}{N}$$

式中：Nは、 $x = 0$ の点の時間 $t = 0$ において媒体10に注入される化合物 $C_1$ の量である；

Iは、 $x$ と無限の間の濃度 $C_1(x, t)$ の積分である；

### 【数9】

$$\alpha_1 = \frac{x}{2\sqrt{D_1 t}} \quad \text{及び} \quad \alpha_2 = \frac{x}{2\sqrt{D_2 t}}$$

図4は $i$ 、 $\alpha$ の関数としての、純度Sおよび収率Rの変化を示す。この図は、所望の純度を選択することによって、化合物Cを収集できる $\alpha$ の値、ひいては $\chi$ の値を決定可能であることと、得られる収率を示している。2つの化合物 $C_1$ および $C_2$ の拡散係数が比3.5で異なる場合、 $\alpha_1 = 0.85$ では化合物 $C_1$ の

25%が90%の純度で回収できる。

### 【0033】

ここで明確にするために、発明者は本発明の適用の短い実施例について説明する。この実施例は、溶液中でのDNAサンプルのRNAへの化学的ハイブリダイゼーションに関する。HIV-1逆転写酵素の1次結合部位を含むRNA標的に対するオリゴデオキシリボヌクレオチドサンプルの場合、結合プロセスは以下の値によって特徴付けられる：

### 【数10】

$$3 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \leq k_1 \leq 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

$$10^{-3} \text{s}^{-1} \leq k_2 \leq 2.5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$$

$$D = 3 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

$$2.7 \times 10^{-18} \text{C} \leq z \leq 5.9 \times 10^{-18} \text{C}$$

第1共鳴条件 $k_1 \cdot p = k_2$ によって、媒体10中のRNA濃度が $10^{-9}$ から $10^{-6}$  Mの範囲で与えられ、これは容易に生成可能である。

### 【0034】

第2共鳴条件 $\omega = 2k_2$ によって、 $2 \times 10^{-10} \text{s}^{-1}$ から $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ の範囲で $\omega$ が得られ、これは容易に満足される。

### 【0035】

電場の振幅に関する最終条件は、この振幅が $4 \times 10^{-5} \text{V} \mu\text{m}$ よりはるかに大きい場合に満足され、このことには技術上の問題はない。

### 【0036】

所与のサンプルにおいて $\omega$ および $p$ の値が $k_1$ および $k_2$ の値に一致すれば、このサンプルをRNA固定反応と電場の間の確率的共鳴条件下に置くことによって、他のサンプルから分離することができる。

### 【0037】

本発明のさらに特に有利な態様において、電荷とは無関係に化合物に作用可能な非電場を使用することも可能である。たとえばこのために、時間とともに周期

的に変化が起きる均質速度場を媒体中で作成する、1個または2個のポンプを備えたHPLC型クロマトグラフィ装置を使用することができるが、これらの速度はおそらく、電場印加によって得られる変位率に匹敵する。上の説明で述べたマグニチュードAは、ポンプによって媒体中に作成される速度の値である。

#### 【0038】

さらに、成分C<sub>i</sub> および製品Q<sub>i</sub> が周期場に従う媒体中で静止状態を維持する必要はない；生成物Q<sub>i</sub> が成分C<sub>i</sub> と異なる方法で、この場の印加に応答することによって十分である。

#### 【0039】

一般に、本発明の方法は、（約10から10<sup>6</sup> ダルトンの範囲の）比較的小型から大型の分子、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖の分離に適用可能であり、この分離は、媒体中における化学反応と時間により周期的に変化する任意の均質場との組合せによって生じる。

#### 【図面の簡単な説明】

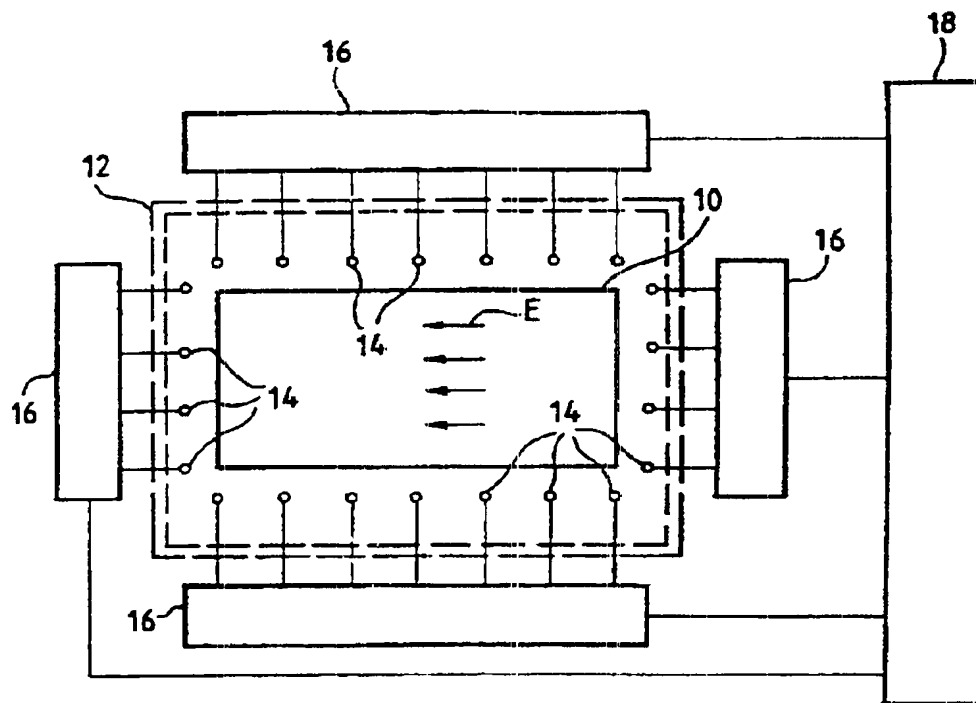
【図1】 媒体に印加される場が電場である好ましい実施形態における、本発明の実施手段の図である。

【図2】 共鳴条件下および異なる条件下での振幅の振幅に相当するパラメータAの関数としての、化合物Cの見かけおよび固有の拡散係数の比の変化を示すグラフである。

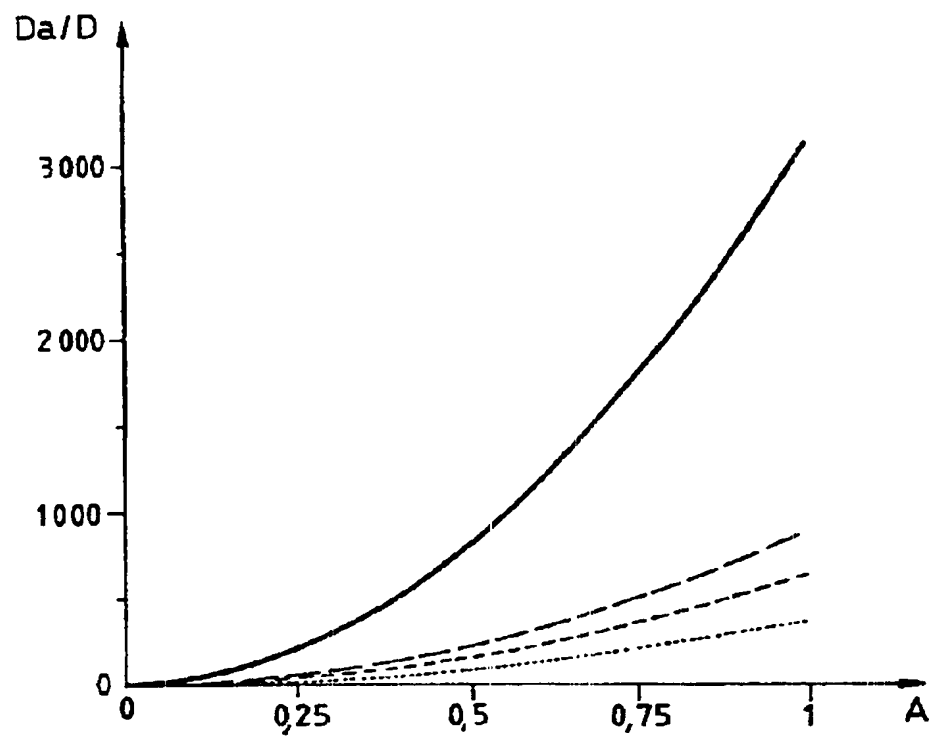
【図3】 化合物の動力学反応定数に相当するパラメータの関数としての、見かけおよび固有の拡散係数の比の変化を示すグラフである。

【図4】 無次元パラメータの関数としての、異なる拡散係数を持つ2つの化合物の等モル混合物の純粋な拡散の場合の、純度および収率の変化を示すグラフである。

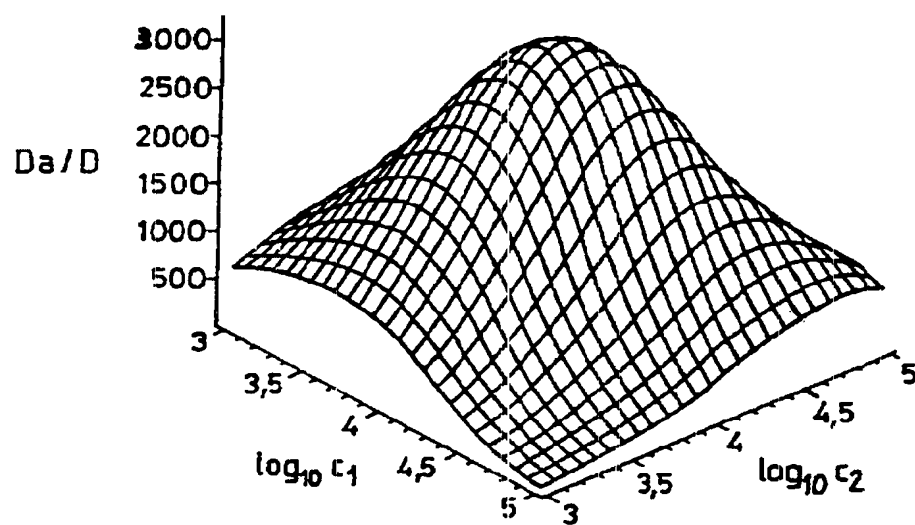
【図1】



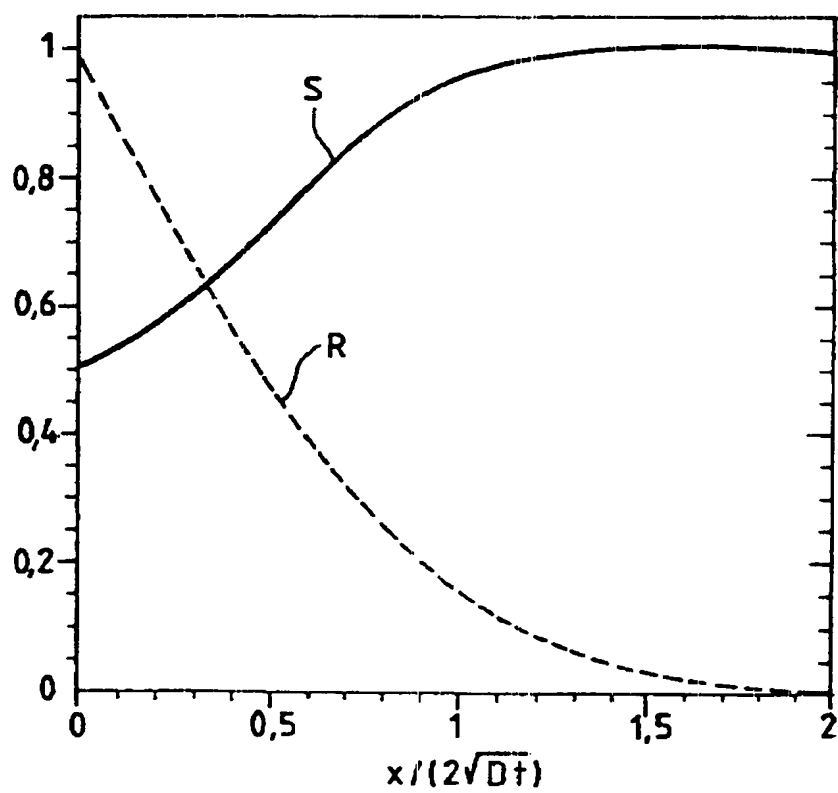
【図2】



【図3】



【図4】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/02974

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N27/447		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 059 294 A (LIZARDI PAUL M) 22 October 1991 (1991-10-22) column 9, line 24 - line 32	1
A	WO 99 45374 A (BOLES T CHRISTIAN ; MOSAIC TECHNOLOGIES (US); ABRAMS EZRA S (US); M) 10 September 1999 (1999-09-10) claim 1	1
A	US 5 084 157 A (CLARK STEVEN M ET AL) 28 January 1992 (1992-01-28) cited in the application the whole document	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 March 2001		Date of mailing of the international search report 05/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Duchatellier, M



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 00/02974

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5059294 A	22-10-1991	NONE	
WO 9945374 A	10-09-1999	AU 2896399 A EP 1068518 A	20-09-1999 17-01-2001
US 5084157 A	28-01-1992	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
G O 1 N	33/48	G O 1 N 27/26	3 1 5 Z
	33/483	C 1 2 N 15/00	Z
		G O 1 N 27/26	3 1 5 H
(72)発明者	ルマルシャン、アニー フランス国、エフー91360 ビルモワソ ン・スール・オルジュ、アブニュ・デュ・ グラン・オルム 45		
F ターム(参考)	2G045 BA13 BB03 DA12 DA13 DA30 DA36 FB05 4D054 FA10 FB20 4H045 AA20 CA30		